

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A23C 9/123, C12R 1/225, 1/46	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/20607 (43) Date de publication internationale: 11 juillet 1996 (11.07.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01761 (22) Date de dépôt international: 29 décembre 1995 (29.12.95) (30) Données relatives à la priorité: 95/00003 2 janvier 1995 (02.01.95) FR 95/12032 13 octobre 1995 (13.10.95) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): COMPAGNIE GERVAIS DANONE [FR/FR]; 126-130, rue Jules-Guesde, F-92302 Levallois-Perret (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BOULEY, Christine [FR/FR]; 14-16, allée de Saint-Cucufa, F-92420 Vaucresson (FR). OUDOT, Elisabeth [FR/FR]; Les Marronniers, Avenue de la Gare, F-91570 Bièvres (FR). DENARIAZ, Gérard [FR/FR]; 84, rue J.-Herbert, F-91310 Longpont-sur-Orge (FR). (74) Mandataires: ORES, Irène etc.; Cabinet Ores, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AM, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>

(54) Title: MILK STARTER CULTURE AND USE THEREOF FOR PREPARING ANTIDIARRHOEAL PRODUCTS

(54) Titre: FERMENT LACTIQUE, ET SON UTILISATION POUR LA PREPARATION DE PRODUITS ANTI-DIARRHEIQUES

(57) Abstract

A milk starter culture consisting of a mixture of three lactic acid bacteria, i.e. *Streptococcus thermophilus* DN-001 147, *Streptococcus thermophilus* DN-001 339, and *Lactobacillus bulgaricus* DN-100 182, is disclosed. Fermented dairy foods prepared by means of the starter defined above, and the uses of said starter and said fermented foods for preparing antidiarrhoeal products, are also disclosed.

(57) Abrégé

Ferment lactique constitué par un mélange des trois bactéries lactiques *Streptococcus thermophilus* DN-001 147, *Streptococcus thermophilus* DN-001 339, *Lactobacillus bulgaricus* DN-100 182. Aliments laitiers fermentés, susceptibles d'être obtenus par la mise en œuvre d'un ferment lactique tel que défini ci-dessus. Utilisations dudit ferment lactique et desdits aliments fermentés pour l'obtention de produits anti-diarrhéiques.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brazil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

FERMENT LACTIQUE, ET SON UTILISATION POUR LA PREPARATION DE PRODUITS ANTI-DIARRHEIQUES.

La présente Invention est relative à des ferments lactiques, et à leurs utilisations, en particulier pour l'obtention de produits dotés de propriétés anti-diarrhéiques.

Les produits laitiers fermentés du type yoghourt sont obtenus par fermentation du lait avec une combinaison de souches des bactéries lactiques *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. Ces bactéries se développent rapidement dans le lait en produisant des quantités importantes d'acide lactique et provoquent la coagulation du lait en quelques heures. Lors de l'ingestion régulière de yoghourt, la flore spécifique du yoghourt apparaît dans les selles, mais disparaît à l'arrêt de la consommation, car elle ne s'implante pas chez l'homme.

D'autres bactéries lactiques font au contraire partie de la flore banale du tractus digestif de l'homme ; il s'agit en particulier de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* et de bactéries du genre *Bidifidobactérium*. Un certain nombre d'espèces de *Lactobacillus* sont présentes dans la flore intestinale de l'homme bien portant, et leur présence assure un rôle d'équilibre vis à vis des autres groupes microbiens.

On a depuis longtemps cherché à obtenir des laits fermentés qui, tout en offrant à la consommation des propriétés organoleptiques agréables, contiennent en quantité élevée des bactéries lactiques présentes naturellement dans la flore intestinale de l'homme, notamment des bactéries du genre *Lactobacillus*, capables de se développer dans l'intestin et de contribuer à l'équilibre de la flore intestinale.

Les espèces *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus acidophilus* font en ce sens l'objet d'un intérêt croissant.

L'effet éventuel de ces bactéries sur certaines pathologies digestives (troubles gastro-intestinaux, gastro-entérites perturbation du transit) a été étudié.

5 Plusieurs études ont ainsi montré chez l'enfant l'effet bénéfique de ferments lactiques, administrés sous forme de laits fermentés ou sous forme de poudre, sur la durée de la diarrhée.

TOUHAMI et al., [Ann. Pédiatr. (Paris) 39,
10 n° 2, p. 79-86 (1992)] ont comparé l'effet du lait et du yoghourt chez l'enfant atteint de diarrhée persistante. 78 enfants hospitalisés présentant une diarrhée persistante depuis au moins 15 jours ont été alimentés par du lait ou du yoghourt. L'échec du traitement étant
15 défini comme une non rémission de la diarrhée au bout de 5 jours, le nombre d'échecs était significativement plus bas dans le groupe yoghourt (15%) que dans le groupe lait (45%). Ce résultat traduit indirectement une diminution de la durée de l'épisode diarrhéique avec le yoghourt.

20 ISOLAURI et al., [Pediatrics, vol. 88 (1), p.90-97 (1991)], ont procédé à une étude chez des enfants atteints de diarrhée aiguë depuis moins de 7 jours. 71 enfants au total, ont reçu du *L. casei* GG (*L. casei* subsp. *rhamnosus*) sous forme lyophilisée, ou un lait
25 fermenté par *L. casei* GG ou un yoghourt thermisé. La durée de la diarrhée après traitement était alors de 2,4 jours dans le groupe témoin contre 1,4 jours dans le groupe *L. casei* GG sous forme lyophilisée ou sous forme d'un lait fermenté, soit une diminution significative de
30 42%.

Selon le même modèle, cette équipe a également étudié sur les diarrhées à rotavirus l'effet de l'administration de *L. casei* GG sous forme de poudre, par rapport à 2 produits du commerce, l'un étant une
35 préparation de *L. casei rhamnosus* (*Lactophilus*) et l'autre un lait fermenté avec les ferments du yoghourt et

contenant *L. casei rhamnosus* (YALACTA®) [MAJAMAA et al., Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition (USA), Apr.1995, 20(3) p. 333-8]. Cette étude montre une réduction significative de la durée de la diarrhée à rotavirus dans le groupe *L. casei* GG (1,8 jours) par rapport aux groupes *Lactophilus* (2,8 jours) et YALACTA® (2,6 jours). Cela se traduit par une réduction de 36% par rapport à *Lactophilus* et de 31% par rapport à YALACTA®.

Les deux études précédentes montrent l'intérêt de *L. casei* subsp. *rhamnosus* dans la réduction de la durée de la diarrhée, du moins dans le cas de diarrhée aiguë ou à rotavirus.

Il a également été montré, chez l'enfant atteint de diarrhée, que la consommation de yoghourt réduit significativement le volume des selles par rapport à la consommation de lait [BHAN et al., Les laits fermentés. Actualités de la Recherche, John LIBBEY Eurotext Ltd, P. 233-239 (1989)].

Le travail de [LING et al., Ann. Nutri. Metab. 36, p. 162-166, (1992)] chez des personnes âgées (non atteintes de diarrhée) montre qu'un lait fermenté par *L. casei* GG normalise la consistance des selles en comparaison avec un groupe contrôle ne consommant pas ce lait fermenté.

Cependant *Lactobacillus casei* a un développement très lent et souvent irrégulier dans le lait, et les produits obtenus ont un goût peu agréable, amer, et souvent en outre trop acide.

De nombreuses tentatives ont été réalisées pour produire des produits fermentés avec *Lactobacillus casei* en association avec tout ou partie des ferments du yoghourt, mais aucune n'a jusqu'à présent permis d'obtenir un résultat satisfaisant.

Il est connu qu'une grande variabilité existe dans les produits obtenus par fermentation, et que le résultat obtenu dépend en grande partie de la nature du

ferment. Par exemple, les courbes de croissance, ainsi que la production d'acide lactique, la production d'arômes et l'épaississement du milieu varient de façon importante, d'une espèce de bactéries lactiques à une
5 autre, et même souvent au sein d'une même espèce.

En outre, les bactéries lactiques sont le plus souvent utilisées sous la forme de ferments complexes, et les interactions entre les différentes souches au cours de la fermentation modifient les propriétés des souches,
10 par rapport à celles observées en culture pure.

Au total, la conjugaison entre la variabilité au sein de chaque espèce, et les interactions entre les différentes souches dans des populations en mélange complexe, rend imprévisible le comportement des souches
15 lactiques dans les ferments.

Or, au cours de leurs recherches sur la symbiose des ferments lactiques, les Inventeurs ont découvert un nouveau ferment du yoghourt particulièrement avantageux lorsqu'il est utilisé en association avec des
20 bactéries du genre *Lactobacillus* pour l'obtention d'un produit laitier fermenté.

La présente Invention a pour objet un ferment du yoghourt constitué par un mélange des trois bactéries lactiques *Streptococcus thermophilus* DN-001 147,
25 *Streptococcus thermophilus* DN-001 339, et *Lactobacillus bulgaricus* DN-100 182, ainsi qu'un ferment lactique, caractérisé en ce qu'il comprend le ferment du yoghourt tel que défini ci-dessus, et comprend en outre une ou plusieurs autres espèces de bactéries lactiques.

30 Ces autres bactéries lactiques peuvent être choisies dans le groupe constitué par les genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, et *Lactococcus*. Elles appartiennent de préférence au groupe *Lactobacillus casei*, et de préférence encore il peut s'agir de la
35 bactérie *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* DN-114 001.

Les souches de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* DN-114 001, *Lactobacillus bulgaricus* DN-100 182, *Streptococcus thermophilus* DN-001 147, *Streptococcus thermophilus* DN-001 339, utilisées pour la
5 présente invention ont été déposées selon le Traité de Budapest le 30 décembre 1994, auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes) tenue par l'Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, à Paris, sous les numéros respectifs : I-1518 pour la
10 souche *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* DN-114 001 ; I-1519 pour la souche *Lactobacillus bulgaricus* DN-100 182 ; I-1520 pour la souche *Streptococcus thermophilus* DN- 001 147 ; le numéro I-1521 pour la souche *Streptococcus thermophilus* DN-001 339.

15 Les caractéristiques de ces souches sont en outre les suivantes :

- Souche *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* DN-114 001

Morphologie : microorganisme Gram-positif, non
20 mobile et ne formant pas de spores, se présentant sous la forme de petits bacilles fins. Métabolisme : hétérofermentaire, catalase (-), gluconate (+). Fermentation des sucres : ribose (+), adonitol (+), galactose (+), glucose (+), fructose (+), mannose (+), L-
25 sorbose (+), mannitol (+), sorbitol (+), alpha-methyl D-glucoside (+), N-acetyl-glucosamine (+), arbutine (+), esculine (+), salicine (+), cellobiose (+), maltose (+), lactose (+), saccharose (+), tréhalose (+), beta-gentiobiose (+), turanose (+), tagatose (+).

30 - Souche *Streptococcus thermophilus* DN-001 147
Morphologie : microorganisme Gram-positif, non mobile et ne formant pas de spores, se présentant sous la forme de gros streptocoques en diplocoques et chaînes courtes. Métabolisme : homofermentaire, catalase (-).
35 Fermentation des sucres : D-glucose (+), D-fructose (+), saccharose (+), lactose (+).

- Souche *Streptococcus thermophilus* DN-001 339.

Morphologie : microorganisme Gram-positif, non mobile et ne formant pas de spores, se présentant sous la forme de gros streptocoques en diplocoques et chaînes
5 courtes. Métabolisme : homofermentaire, catalase (-). Fermentation des sucres : D-glucose (+), saccharose (+), lactose (+).

- Souche *Lactobacillus bulgaricus* DN-100 182 :

Morphologie : microorganisme Gram-positif, non
10 mobile et ne formant pas de spores, se présentant sous la forme de bacilles très courts et trapus. Métabolisme : homofermentaire, catalase (-). Fermentation des sucres : ribose (+), D-glucose (+), D-mannose (+), lactose (+).

L'association du ferment du yoghourt conforme
15 à l'Invention avec des bactéries du genre *Lactobacillus*, et avec *Lactobacillus casei* en particulier, permet d'obtenir des produits possédant une population élevée de Lactobacilles, une très bonne stabilité au cours du temps, une texture onctueuse et d'excellentes propriétés
20 organoleptiques.

L'Invention a également pour objet un procédé de préparation d'un produit laitier fermenté, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend la mise en oeuvre d'un ferment du yoghourt ou d'un ferment lactique
25 conforme à l'Invention, tels que définis ci-dessus.

La présente Invention a également pour objet les produits laitiers fermentés susceptibles d'être obtenus par un procédé conforme à l'Invention, tel que défini ci-dessus.

30 Selon un mode de réalisation préféré d'un produit laitier fermenté conforme à l'Invention, il contient entre 1×10^8 et $1,2 \times 10^9$ cellules de *L. casei* par ml, entre 2×10^8 et 1×10^9 cellules de *S. thermophilus* par ml, et entre 4×10^6 et 2×10^7 cellules de *L. bulgaricus* par
35 ml.

Des produits laitiers fermentés conformes à l'Invention peuvent être à base de lait entier, écrémé ou supplémenté, pouvant contenir notamment des matières grasses, des matières sèches hydrophiles du lait, des protéines de soja, des sucres et des fruits en morceaux ou en purée.

Les Inventeurs ont également constaté que les ferments lactiques et les préparations de lait fermenté conformes à l'Invention, associant des ferments du yoghourt avec des *Lactobacillus*, possédaient des propriétés anti-diarrhéiques supérieures à celles des ferments et préparations de l'art antérieur préconisées dans ce but.

La présente Invention a également pour objet l'utilisation de ferments lactiques et de préparations de lait fermenté conformes à l'invention, pour l'obtention de produits anti-diarrhéiques.

La présente Invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples d'obtention de préparations de lait fermenté mettant en oeuvre des ferments lactiques conformes à l'Invention, et à des exemples montrant leurs propriétés anti-diarrhéiques.

Il doit être bien entendu toutefois que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'Invention dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 - OBTENTION DE PREPARATIONS DE LAIT FERMENTE : COMPARAISON DE FERMENTS LACTIQUES CONFORMES A L'INVENTION AVEC DES FERMENTS LACTIQUES DE L'ART ANTERIEUR.

On ajoute de la poudre de lait à du lait entier, à raison de 4 grammes de poudre pour 100 grammes de lait. Après homogénéisation, le mélange est pasteurisé 10 minutes à 95°C, puis refroidi à 38°C avant d'être

ensemencé avec des cultures actives des différentes souches.

- La préparation A contient uniquement la souche *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* DN-114 001, ensemencée à une concentration initiale de 2×10^7 cellules par ml. Après 35 heures d'incubation à 37°C, le pH atteint la valeur de 4,7 et la préparation est conservée à 4°C. La concentration de la souche DN-114 001 est alors de 4×10^9 cellules par ml.

10 - La préparation B est ensemencée avec le mélange des souches : *Streptococcus thermophilus* DN-001 147 (5×10^4 cellules par ml), *Streptococcus thermophilus* DN-001 339 (5×10^3 cellules par ml), et *Lactobacillus bulgaricus* DN-100 182 (1×10^5 cellules
15 par ml). L'incubation est réalisée à 37°C ; après environ 1 heure, le pH atteint 4,7, et la préparation est transférée à 4°C. Les concentrations dans le produit fermenté sont : *Streptococcus thermophilus* DN-001 147
Streptococcus thermophilus DN-001 339 (5×10^8 cellules
20 par ml.), et *Lactobacillus bulgaricus* DN-100 182 (7×10^6 cellules par ml).

- La préparation C est une préparation commerciale de ferments du yoghourt THY71 (TEXEL) utilisée comme contrôle dans le test de dégustation. La
25 préparation est ensemencée avec *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* à des concentrations identiques (environ 3×10^6 cellules par ml). Après 3h30 d'incubation à 44°C, on atteint un pH de 4,7 et la préparation est conservée à 4°C. La
30 concentration est alors de 5×10^8 cellules par ml pour *S. thermophilus* et 2×10^8 cellules par ml pour *L. bulgaricus*.

- La préparation D est ensemencée avec le mélange des souches suivantes : *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* DN-114 001 (2×10^7 cellules par ml),
35 *Streptococcus thermophilus* DN-001 147 (5×10^4 cellules par ml), *Streptococcus thermophilus* DN-001 339 (5×10^3

cellules par ml), et *Lactobacillus bulgaricus* DN-100 182 (1×10^5 cellules par ml). L'incubation est réalisée à 37°C ; après environ 12 h d'incubation, le pH atteint 4,7 et la préparation est transférée à 4°C. Les concentrations dans le produits fermenté sont *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* DN-114 001 (6×10^8 cellules par ml) *Streptococcus thermophilus* DN-001 147 et *Streptococcus thermophilus* DN-001 339 (5×10^8 cellules par ml), et *Lactobacillus bulgaricus* DN-100 182 (1×10^7 cellules par ml).

- Les propriétés organoleptiques des quatre préparations sont évaluées après 7 jours de conservation à 8°C.

Les résultats sont illustrés par le Tableau I ci-dessous :

TABLEAU I

Préparation	Texture	Arôme / goût	Appréciation générale
- A -	Cassant Granuleux Légèrement épais	Caillé, Amer, Goût légèrement rance.	(-)
- B -	Epais Onctueux	Fade	(+)
- C -	Epais	Arôme yoghourt type Goût frais	(+++)
- D -	Très épais Onctueux	Goût crémeux	(+++)

La préparation -D- présente une population élevée en *L. paracasei* subsp. *paracasei*, une très bonne stabilité au cours du temps, une texture onctueuse, et d'excellentes propriétés organoleptiques.

**EXEMPLE 2 : INFLUENCE DE PREPARATIONS DE LAIT
FERMENTE CONFORMES A L'INVENTION SUR LA DUREE DE LA
DIARRHEE**

Les préparations utilisées sont les
5 suivantes :

- préparation "Yoghourt": il s'agit de la
préparation B obtenue, comme décrit à l'Exemple 1 ci-
dessus, à partir d'un ferment du yoghourt conforme à
l'Invention.

10 - préparation "B.C." : il s'agit de la
préparation D obtenue, comme décrit à l'Exemple 1 ci-
dessus, à partir du ferment lactique conforme à
l'Invention.

- préparation "Lait" : il s'agit d'un lait
15 gélifié, non-fermenté, dont la composition est la
suivante :

- Saccharose	6 g
- Guar	0,6 g
- Carraghenane	0,15 g
20 - Lait entier	QSP 100 ml.

Cette préparation a été traitée à 130°C
pendant quelques secondes.

L'étude est réalisée sur une population de 265
enfants en crèche. Les enfants ont été répartis en 3
25 groupes par randomisation et ont consommé régulièrement
125 g (enfants de 6 à 18 mois), ou 250 g (enfants de plus
de 18 mois) soit de la préparation "Lait", soit de la
préparation "Yoghourt", soit de la préparation "B.C.",
pendant 3 périodes successives de 1 mois, entrecoupées de
30 périodes sans supplémentation de 1 mois. L'essai a été
conduit en double aveugle.

L'analyse est effectuée sur la population
d'enfants ayant présenté au moins un épisode diarrhéique
(n = 62) au cours de la période d'observation (6 mois).

35 La durée de la diarrhée est définie comme le
temps écoulé entre l'apparition de la diarrhée (3 selles

liquides par jour) et la disparition des selles liquides. Plus pratiquement, cela représente le nombre de jours après apparition de l'épisode diarrhéique, pendant lesquels l'enfant présente encore au moins une selle
 5 liquide. Les résultats sont représentés dans le Tableau II ci dessous.

TABLEAU II

Produit	Nombre d'enfants	Nombre de jours de diarrhée
Lait	20	3,8 \pm 1,8
Yoghourt	24	3,1 \pm 1,7
B. C.	18	2,9 \pm 2,6
Total	62	3,3 \pm 2,0

Ces résultats montrent que, chez les enfants présentant des diarrhées, la supplémentation de
 10 l'alimentation avec la préparation "Yoghourt" ou la préparation "B.C." réduit le nombre de jours de diarrhée par rapport à la préparation "Lait". Cette réduction est de 18% dans le cas de la préparation "Yoghourt", et de
 24% dans le cas de la préparation "B.C.".

15 **EXEMPLE 3 - INFLUENCE DES DIFFERENTES PREPARATIONS SUR LA DUREE DE NORMALISATION DES SELLES**

L'analyse est effectuée sur la même population d'enfants (n = 62) que l'exemple 2.

20 La durée de normalisation des selles est le temps écoulé entre la dernière selle liquide et le retour à des selles moulées. Plus pratiquement, cela représente la durée requise pour un retour à un transit normal.

Les résultats sont représentés dans le Tableau III ci dessous.

TABLEAU III

Produit	Nombre d'enfants	Nombre de jours avant normalisation
Lait	20	2,6 \pm 2,4
Yoghourt	24	2,0 \pm 1,6
B. C.	18	1,2 \pm 1,0
Total	62	1,9 \pm 1,8

Ces résultats montrent que chez les enfants ayant présenté des diarrhées, la supplémentation de l'alimentation avec la préparation "B.C." réduit significativement le temps de normalisation des selles par rapport à la préparation "Lait" ; la réduction observée est de 54%. Le temps de normalisation des selles est plus rapide avec la préparation "B.C." (1,2 \pm 1,0) qu'avec la préparation "Yoghourt" (2,0 \pm 1,6).

EXEMPLE 4 - INFLUENCE DES DIFFERENTES PREPARATIONS SUR LA DUREE TOTALE DE L'EPISODE DIARRHEIQUE.

L'analyse est effectuée sur la même population d'enfants (n = 62) que l'exemple 2.

La durée totale de l'épisode diarrhéique est le temps écoulé entre le début de la diarrhée (> trois selles liquides par jour) et la fin de la période de normalisation (retour à des selles moulées). Si un enfant a présenté plus d'un épisode diarrhéique, cette analyse prend en compte l'épisode où ce délai calculé est le plus grand.

Les résultats sont représentés dans le Tableau V ci dessous

TABLEAU V

Produit	Nombre d'enfants	Perturbation du transit intestinal (jours)
lait	20	8,0 \pm 5,3
Yoghourt	24	5,3 \pm 2,5
B. C.	18	4,3 \pm 2,7
Total	62	5,9 \pm 3,9

Ces résultats montrent que chez les enfants ayant présenté des diarrhées, la supplémentation de l'alimentation avec la préparation "B.C." réduit significativement le nombre total de jours où le transit intestinal de l'enfant est perturbé par rapport à la préparation "Lait" ; la réduction observée est de 46%. Le nombre de jours avec des selles anormales en consistance ou en fréquence est plus faible avec la préparation "B.C." (4,3 \pm 2,7), qu'avec la préparation "Yoghourt" (5,3 \pm 2,5).

Conclusion :

Les préparations conformes à l'Invention permettent donc de réduire la durée totale de l'épisode diarrhéique, en diminuant la durée pendant laquelle l'enfant présente une ou plusieurs selles liquides par jour et en diminuant la durée pendant laquelle l'enfant présente des selles molles. La propriété anti-diarrhéique se traduit également par une diminution du nombre de jours pendant lesquels l'enfant présente des selles de consistance ou de fréquence anormales.

Les résultats sont représentés dans le Tableau IV ci dessous

TABLEAU IV

Produit	Nombre d'enfants	Durée totale de l'épisode diarrhéique (jours)
Lait	20	6,9 \pm 3,0
Yoghourt	24	4,8 \pm 2,3
B. C.	18	3,9 \pm 2,4
Total	62	5,2 \pm 2,8

Ces résultats montrent que chez les enfants ayant présenté des diarrhées, la supplémentation de l'alimentation avec la préparation "B.C." réduit significativement la durée totale de l'épisode diarrhéique ; la réduction observée est de 44% par rapport à la préparation "Lait", et de 19% par rapport à la préparation "Yoghourt". La durée totale de l'épisode diarrhéique est plus courte avec la préparation "B.C." (3,9 \pm 2,4) qu'avec la préparation "Yoghourt" (4,8 \pm 2,3).

EXEMPLE 5 - INFLUENCE DES DIFFERENTES PREPARATIONS SUR LE NOMBRE TOTAL DE JOURS OU LES ENFANTS PRESENTENT UN TRANSIT INTESTINAL PERTURBE.

L'analyse est effectuée sur la même population d'enfants (n = 62) que l'exemple 2.

Le nombre total de jours où les enfants présentent un transit intestinal perturbé est calculé en sommant le nombre de jours où les enfants ont présenté une ou plusieurs selles anormales en consistance ou en fréquence. Lorsque l'enfant a présenté plusieurs épisodes diarrhéiques, l'analyse prend en compte l'ensemble de ces épisodes.

REVENDEICATIONS

1) Ferment lactique, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un ferment du yoghourt constitué par un mélange des trois bactéries lactiques *Streptococcus thermophilus* DN-001 147, *Streptococcus thermophilus* DN-001 339, et *Lactobacillus bulgaricus* DN-100 182

2) Ferment lactique caractérisé en ce qu'il comprend le ferment du yoghourt selon la revendication 1, et comprend en outre une ou plusieurs autres espèces de bactéries lactiques.

3) Ferment lactique selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend un mélange des bactéries lactiques *Streptococcus thermophilus* DN-001 147, *Streptococcus thermophilus* DN-001 339, *Lactobacillus bulgaricus* DN-100 182, et *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* DN-114 001.

4) Procédé de préparation d'un produit laitier fermenté, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend la mise en oeuvre d'un ferment lactique selon une quelconque des revendications 1 à 3.

5) Préparation de lait fermenté, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par le procédé selon la revendication 4.

6) Ferment lactique selon une quelconque des revendications 1 à 3, pour l'utilisation comme anti-diarrhéique.

7) Préparation de lait fermenté, selon la revendication 5, pour l'utilisation comme anti-diarrhéique.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC1/FR 95/01761

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A23C9/123 C12R1/225 C12R1/46

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A23C C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR,A,2 073 279 (INSTITUT MERIEUX) 1 October 1971 see claims.	1-7
A	FR,A,2 335 157 (STENVAL S.A.) 15 July 1977 see claims	1-7
A	GB,A,2 228 494 (INSTITUT MIKROBIOLOGIL AKADEMIL NAUK UZBEXKOI SSR) 29 August 1990 see claims; examples	1,2,4
A	GB,A,1 110 977 (DAIRY TECHNICS, INC.) 24 April 1968 see claims	1



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 April 1996

Date of mailing of the international search report

09.05.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bevan, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC1/FR 95/01761

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ANNALS OF AGRICULTURAL SCIENCE., vol. 31, no. 2, CAIRO, EGYPT., pages 1279-1289, XP000568695 M.A. EL-NAWAY ET AL.: "Production of new type of yoghurt." see page 1280, last paragraph - page 1281, paragraph 1 ---	1-7
A	FR,A,2 330 334 (BODIELAIR) 3 June 1977 see claims -----	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCI/FR 95/01761

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A-2073279	01-10-71	NONE	
FR-A-2335157	15-07-77	BE-A- 849179	08-06-77
		DE-A- 2657418	30-06-77
		LU-A- 76405	10-07-78
		NL-A- 7613967	21-06-77
GB-A-2228494	29-08-90	SU-A- 1706513	23-01-92
		FR-A- 2656799	12-07-91
		JP-T- 3500251	24-01-91
		WO-A- 9000352	25-01-90
GB-A-1110977		NONE	
FR-A-2330334	03-06-77	NONE	

PC1/FR 95/01761

page 1 de 2

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	ANNALS OF AGRICULTURAL SCIENCE., vol. 31, no. 2, CAIRO, EGYPT., pages 1279-1289, XP000568695 M.A. EL-NAWAWY ET AL.: "Production of new type of yoghurt." voir page 1280, dernier alinéa - page 1281, alinéa 1 ---	1-7
A	FR,A,2 330 334 (BODIELAIR) 3 Juin 1977 voir revendications -----	1-7

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Der. Internationale No

PCT/FR 95/01761

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR-A-2073279	01-10-71	AUCUN	
FR-A-2335157	15-07-77	BE-A- 849179 DE-A- 2657418 LU-A- 76405 NL-A- 7613967	08-06-77 30-06-77 10-07-78 21-06-77
GB-A-2228494	29-08-90	SU-A- 1706513 FR-A- 2656799 JP-T- 3500251 WO-A- 9000352	23-01-92 12-07-91 24-01-91 25-01-90
GB-A-1110977		AUCUN	
FR-A-2330334	03-06-77	AUCUN	